ヘリウムキャリアガスを用いた内径0.18mmの高効率GCカラムによる受託ラボプログラム(CLP)の農薬分析

アプリケーション

環境

著者

Ken LynamおよびWilliam Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, Delaware 19808
U.S.A.

要旨

ヘリウムキャリアガスを用いた、高効率GCカラム(20m×内径0.18mm×膜厚0.18µm)での受託ラボプログラム(CLP)の農薬分析を行いました。1次分析にはDB-17ms固定相のカラムを、確認用にはDB-XLB固定相のカラムを使用しました。このプロトコルで22種のCLP農薬の1次分析と確認に要した時間は11分間で、内径0.32mmのカラムを使用した場合と比較して分析時間が35%短縮されました。

メソッド変換ソフトウェアにより、水素キャリアガスを使用する元の分析条件は、ヘリウムキャリアガスを使用する新しい分析条件に正しく変換されました。このソフトウェア(無償でダウンロード可能)[1]を使用して元のメソッドから新しいメソッドに正確に変換されているかを見るために、溶出順序と分離度を示しました。

はじめに

環境復旧確認用サンプルに含まれる有機塩素系農薬 (OCPs) の測定は、競争の激しい受託ラボ市場で多くの需要がある重要な分析です。標準的な受託ラボプログラム (CLP) の農薬メソッドは、このような分析に使用されます。多くの場合、ラボでは特定プロジェクトの実行過程で大量のサンプルを分析するので、ラボとそのクライアントの両者に大きなコストが発生します。本アプリケーションでは、ラボの生産性向上を実現する手段として、内径0.18mmの高効率GCカラムの有効性について実証します。このカラムは、標準のガスクロマトグラフや、ヘリウムキャリアガスを用いた分析に広く使用することができます。このカラムは効率が高く、既存のGCと組み合わせることで、サンプル処理数を増大する強力なツールになります。30m×内径0.32mmのカラムと20m×内径0.18mmのカラムの分析時間を比較すると、17分の分析がわずか11分に短縮され、分離能も向上することがわかりました[2]。

CLP農薬分析における内径0.18mmのカラムの有効性を証明し、標準のガスクロマトグラフでこのカラムを使用できることを示すために、ヘリウムキャリアガスを選択しました。20m×内径0.18mmのカラムで設定されるガス圧は、33psi (初期値) ～50psi (温度プログラムの最高点) の範囲です。内径0.18mmのカラムでヘリウムガスに使用したガス圧の範囲は、標準のクロマトグラフの作動範囲内に十分収まります。

実験

この実験は、デュアル µECDを搭載したAgilent 6890N GCと7683Bオートサンプラを使用して行いました。Y字型スプリッタを通じて2つの分析カラムに接続したリテンションギャップカラムの先端へのサンプル導入には、スプリット/スプリットレス注入口を使用しました。クロマトグラフ条件の詳細を表1に示します。

表1　クロマトグラフ条件

GC	Agilent 6890N
サンプラ:	Agilent 7683B、5μLシリンジ (部品番号5181-1273)、0.5μL注入
注入口	スプリット/スプリットレス、250°C、 パルスドスプリットレス (35psi、0.5分間)
注入口ライナ	不活性処理したシングルテーパの ダイレクトコネクトライナ (部品番号1544-80730)
キャリア	ヘリウム(一定流量、120°Cで49.5cm/s、 大型ユニバーサルトラップで精製 部品番号RMSH-2)
リテンション ギャップ	5m×内径0.25mm、不活性処理 (部品番号160-2255-5)
Y字型スプリッタ	不活性処理済石英(部品番号5181-3398)
カラム:	
1	20m×内径0.18mm×0.18μm、DB-17ms (部品番号121-4722)
2	20m×0.18mm×0.18μm、DB-XLB (部品番号121-1222)
オーブン	120°C (0.49分間)、160°Cまで85°C/min、 260°Cまで20°C/min (0.20分間) 285°Cまで25°C/min、300°Cまで40°C/min (3.5分間)
検出	μECD、325°C、窒素メイクアップガス、 カラム+メイクアップフロー一定、 (60mL/min)

この実験で使用した流路の部品を次の表2に示します。

表2　流路の部品

		部品番号
バイアル	スクリューキャップ(茶)	5182-0716
バイアルキャップ	スクリューキャップ(青)	5282-0723
バイアルインサート	100μLガラス/樹脂足付	5181-1270
シリンジ	5μL	5181-1273
セプタム	アドバンスドグリーン	5183-4759
注入口ライナ	不活性処理した シングルテーパの ダイレクトコネクト	1544-80730
フェラル	内径0.4mm (短)、 85/15 ベスペル/ グラファイト	5181-3323
Y字型スプリッタ	不活性処理済石英	5181-3398
シーリング用樹脂	ポリイミドシーリング樹脂	500-1200
20倍拡大鏡	20倍拡大ルーペ	430-1020
カラムカッタ	セラミック ウエハカラムカッタ	5181-8836

サンプル前処理法

CLP農薬標準溶液はAccuStandard(New Haven、CT 06513-USA)から購入しました。ULTRA RESI ANALYZEDグレードの2,2,4-トリメチルペンタンはJ. T. Baker(Phillipsburg、NJ 08865-USA)から購入しました。2つの100mLメスフラスコを使用してCLP-023R-160XとCLP-024R-160Xの濃縮液を2,2,4-トリメチルペンタンで個別に希釈し、以降の希釈時に混合しました。メスフラスコとピペットは、すべてAクラスのものを使用しました。このプロトコルの微量対象化合物の標準濃度範囲は1.6～40ng/mLです。

両方のカラムへの注入量を0.5μLにした場合、微量対象化合物のカラムへの注入量の範囲は0.4～10pgです。

Y字型スプリッタ使用時のカラム取り付けのヒント

Y字型スプリッタの取り付けは次のように行いました。Y字型スプリッタに挿入するフューズドシリカチューブを切断する前に、その外側にポリイミドシーリング樹脂を薄く塗布しました。次に、チューブの塗布部分を切断しました。切断面を20倍の拡大ルーペで調べ、切断面がきれいで、余分なシーリング剤がカラム内部に拡散していないことを確認しました。きれいに切断され、外側だけにポリイミドシーリング剤が付着したフューズドシリカをY字型スプリッタの希望する分岐に挿入し、約45秒間そのまま保持してシールしました。スプリッタとチューブの接触部分にシーリング剤の細い輪があることにより、シーリングが良好であることが確認できます。この手順を、最初は分析用カラム、次にリテンションギャップに挿入するY字型スプリッタの胴体部分について行いました。この取り付け方法により、数百回ものオーブン温度プログラムサイクルを繰り返しても2か月以上(現時点まで)問題なく維持され、密着性と信頼性の高い接続が得られました。

結果および考察

このアプリケーションの基礎は、WoolおよびDecker [3]が開発した0.18mm高効率カラムと水素キャリアガスを用いたCLP農薬分析の条件です。この分析では、水素キャリアとフロープログラミングを使用することで、CLP農薬の1次的な分離と確認の分析が7分間でできました。水素キャリアを使用する分離のクロマトグラフパラメータを、メソッド変換ソフトウェアに初期設定値として入力し、ヘリウムキャリアを使用するメソッドに変換しました。安全管理方針などで水素キャリアの使用に消極的なラボ向けに、キャリアガスとしてヘリウムを選択しました。高効率GCカラムは、ヘリウムと水素のいずれのキャリアガスも使用できるだけでなく、分析時間も短縮します。

0.18mmカラムはサンプル容量が小さいという理由から、重いマトリックスがあるサンプルに使用する場合にはカラム前部を頻繁にトリミングする必要があることが、WoolとDecker [3]の論文に示されています。この実験では、5m×内径0.25mmのリテンションギャップとY字型コネクタを分析カラムの前に取り付けて、内径の大きいキャピラリカラムに対し減少したサンプル容量を補正しました。また、リテンションギャップは、有害なマトリックスの影響から分析カラムを守り、カラムの有効寿命を延ばすためにも役立ちます。

アジレントのメソッド変換ソフトウェアによって、確立されたGCメソッドを、高効率GCカラムに対応する条件に容易に変換できます。元のメソッドのクロマトグラフ条件と新しいカラム寸法を、ソフトウェアのメニュー方式のテーブルに入力します。これにより、新しいクロマトグラフ設定値をすべて含む変換後のメソッドテーブルが作成されます。多くの場合、ソフトウェアで作成される新しい設定値を用いるだけで、メソッドは正しく変換できます。

メソッド変換ソフトウェアには、translate only、best efficiency、fast analysisの3つの主要なメソッド変換モードがあります。“translate only”モードでは、Van Deemter曲線上の相対的な位置、分離度、溶出順序の点で元のメソッドに最も類似した条件が作成されます。“best efficiency”モードでは、カラム効率を優先した条件が作成されます。“fast analysis”モードでは、分析速度が優先された条件が作成されます。さまざまなモードを使用することにより、わずかなキー操作だけで、特定のアプリケーション向けのメソッドを容易に作成できます。

このソフトウェアは、キャリアガスが異なるメソッドに変換する場合に非常に有効です。元のメソッドを別のキャリアガスを使用するメソッドに変換するには、元のメソッドの設定値、新しいカラム寸法、希望のキャリアガスの種類を入力します。これにより、新しいカラムとキャリアガスでの変換後のメソッドの設定値が作成されます。アジレントのメソッド変換ソフトウェアの詳細については、http://www.chem. agilent.com/cag/servsup/usersoft/files/GCTS.htmをご覧ください。

メソッド変換ソフトウェアはフロープログラミングには対応していないため、希望の結果を得るために流量パラメータの微調整が必要な場合があります。フロープログラミングされたメソッドを変換するときに、初期流量または中間時の流量を元のメソッドパラメータテーブルに入力すると、変換後のメソッドテーブルの他のパラメータの値に与える影響を確認することができます。したがって、いくつかの異なる流量でデータを収集し、アプリケーションに最適な条件を選択できます。

このCLP農薬の例では、元のメソッドで水素キャリアとフロープログラミングを使用していました。初期流量パラメータを、新しいカラム寸法とともにメソッド変換ソフトウェアに入力し、キャリアガスとしてヘリウムを指定しました。ソフトウェアでTranslate-onlyモードを選択して、図1に示す変更後のメソッドの各設定値を作成しました。

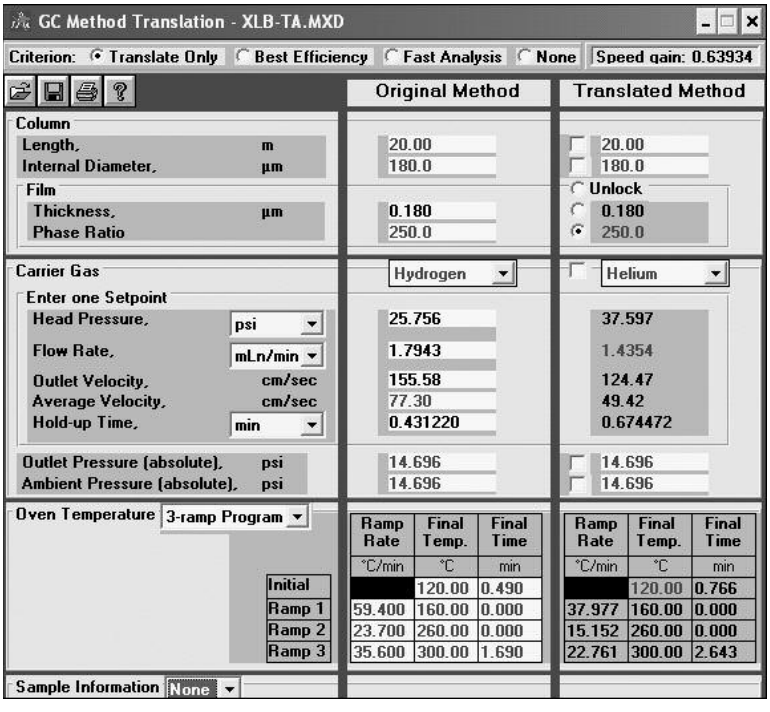

図1. translate-onlyモードを使用したメソッドの変換

メソッド変換ソフトウェアのtranslate-onlyモードを使用してDB-17msカラムで行ったCLP農薬の分離結果を図2に示します。DB-17msカラムでは22のすべての化学種がベースライン分離され、DB-XLBカラムでは、γ-クロルデン、α-クロルデン、エンドスルファンIで構成される、一部だけが分離した3つのピーク間での重なりがあることに注意してください(図3)。この一部だけが分離した3つのピーク間の重なりは、水素キャリアガスを使用した元のDB-XLBによる分離でも観察されていました。

表3に、クロマトグラム中の番号を付けたピークに対応する標準化合物の名前を示します。変換後の新しいメソッドとヘリウムキャリアを使用した場合も、分離度や溶出順序などの分離特性が元のメソッドと厳密に一致しました。元のメソッドは正しく変換され、それ以上のメソッド開発を行う必要はありませんでした。

残念なことに、元のメソッドのDB-XLBで分離できない3つのピークの重なりは、変換後のメソッドでも分離できませんでした。その後のメソッド開発では、DB-XLB確認用カラムで一部だけが分離した3つのピークを分離することと、分析時間を短縮することに重点を置きました。この問題の一部は解決できましたが、重なった3つのピークのうち、2つのピークについては、DB-XLB確認用カラムでも分離が十分でない状態です。一方、分析時間は11分に短縮されました。DB-17msカラムでは、これらの実験でプロトコルのすべての化学種が分離されました(図4)。DB-XLBで重なり合っている3つのピークの分離(図5)は、理想的ではありませんが、DB-17msで良好に分離された化学種のピークを確認する目的で使用するには十分です。

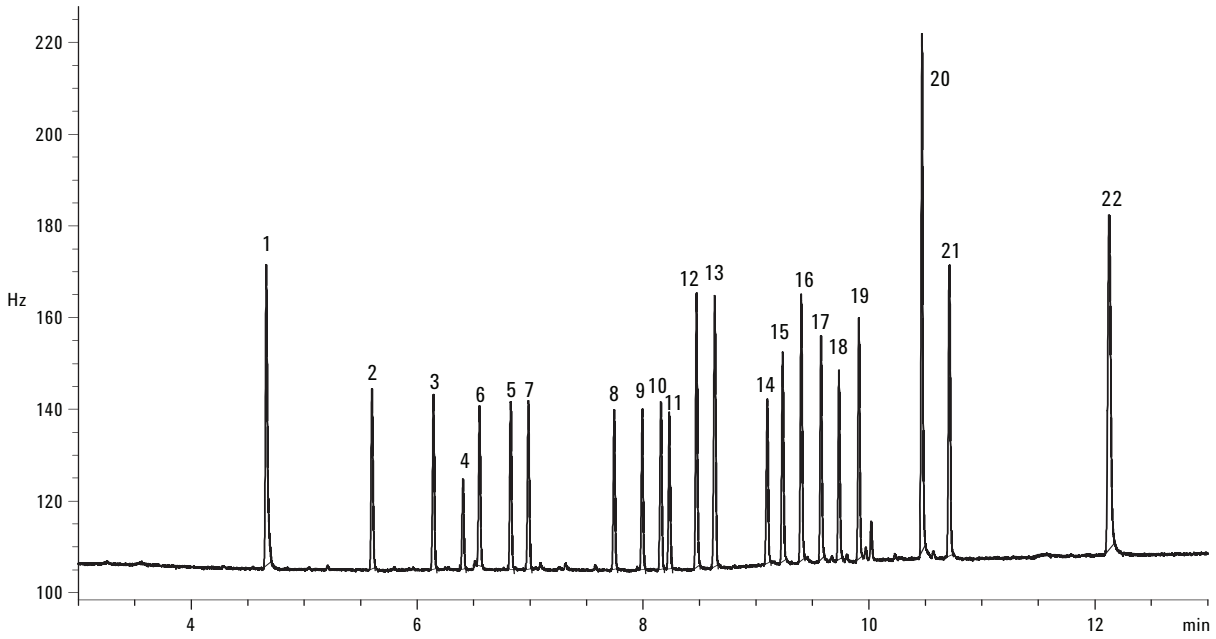

図2.　微量対象化合物を1成分につき0.4pg注入したときの20m×0.18mm×0.18µm 、DB-17ms (部品番号121-4722)によるTranslate-onlyモードでの分離(条件は図1に示す通り)

表3.　CLP標準化合物の一覧

1. テトラクロロ-m-キシレン
2. α-BHC
3. γ-BHC
4. β-BHC
5. δ-BHC
6. ヘプタクロル
7. アルドリン
8. ヘプタクロルエポキシド
9. γ-クロルデン
10. α-クロルデン
11. エンドスルファンI
12. 4,4′-DDE
13. ディルドリン
14. エンドリン
15. 4,4′-DDD
16. エンドスルファンII
17. 4,4′-DDT
18. エンドリンアルデヒド
19. エンドスルファンスルフェート
20. メトキシクロル
21. エンドリンケトン
22. デカクロロビフェニル

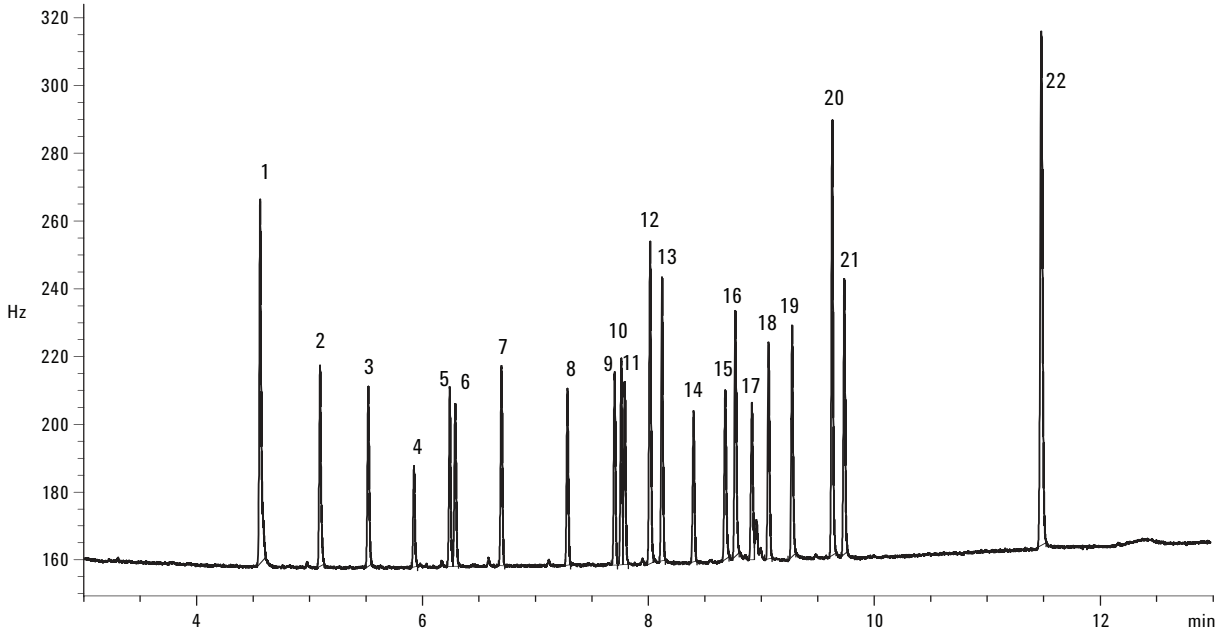

図3. 微量対象化合物を1成分につき0.4pg注入したときの20m×0.18mm×0.18µm、 DB-XLB (部品番号121-1222)による Translate-onlyモードでの分離(条件は図1に示す通り)

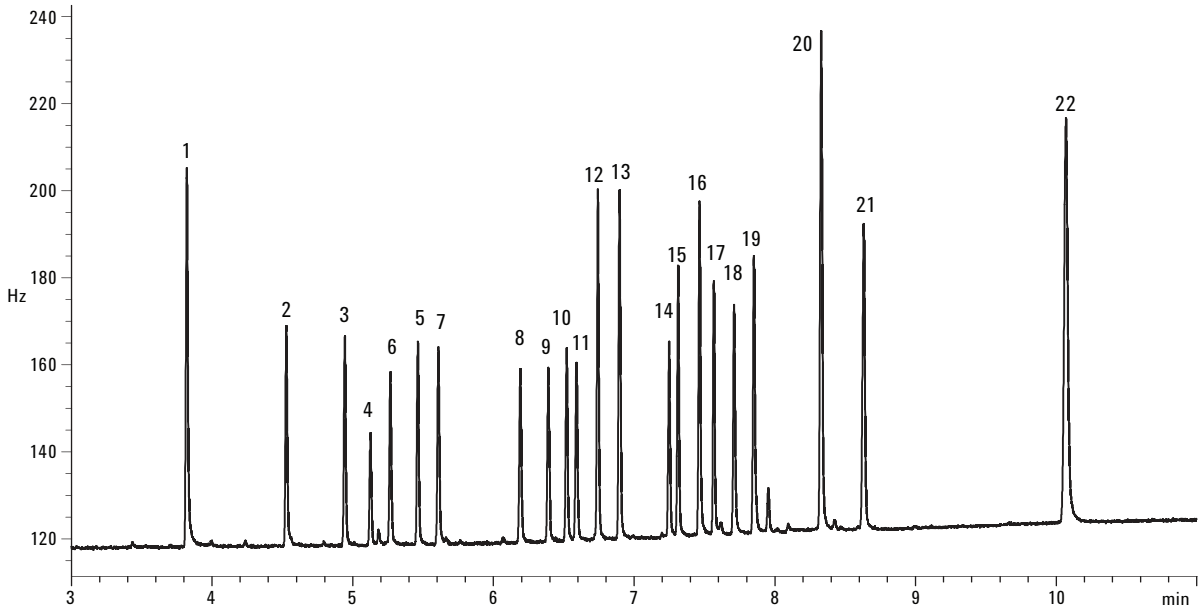

図4. 微量対象化合物を1成分につき0.4pg注入したときの20m×0.18mm×0.18µm 、DB-17ms (部品番号121-4722)による 最適化された分離(条件は表1)

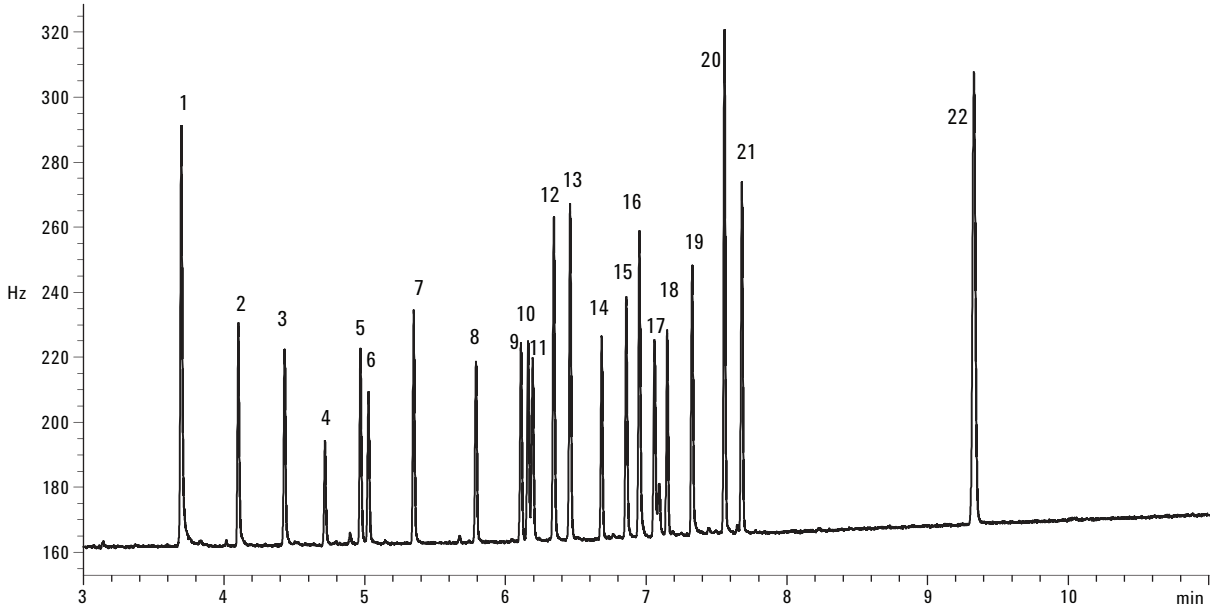

図5. 微量対象化合物を1成分につき0.4pg注入したときの20m×0.18mm×0.18µm、DB-XLB（部品番号121-1222）による最適化された分離（条件は表1）

検出器の感度と直線性

微量対象化合物の1成分につき0.4pgのカラムへの注入を行うために、0.5µLの注入を2つのカラムに分割しました。このデータは、検出下限を少なくとも1桁低く設定できる可能性を示唆しています。これらの化学種とµECD検出を使用した感度と直線性の測定により、この主張が立証されました[4]。対象化合物の濃度範囲は1.6～40ng/mLです。この範囲は、プロトコルの上下の標準的な基準である16倍の範囲を満たし、検出器が動作可能なダイナミックレンジの中央部分だけに相当します。微量成分を0.4pg導入したときのDB-17msによる分離の結果を図3に示します。同じ成分を10pg導入したときの同じ分離の結果を図6に示します。

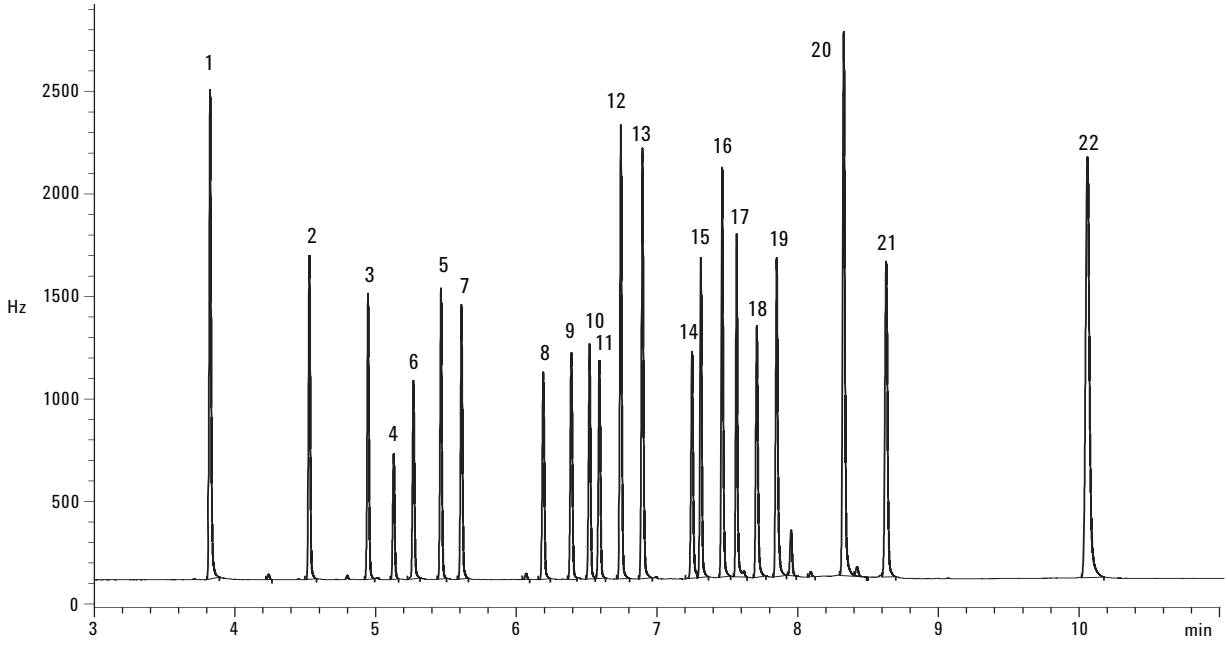

図6. 微量対象化合物を1成分につき10pg注入したときの20m×0.18mm×0.18µm 、DB-17ms（部品番号121-4722）による最適化された分離（条件は表1）

結論

CLP農薬プロトコルにおける22のすべての化学種の分離と確認を、ヘリウムキャリアガスを使用して11分で実行できました。この結果は、CLP農薬分析における内径0.18mmの高効率GCカラムの有効性を実証するものです。濃度範囲1.6～40ng/mLの農薬標準溶液0.5µLを注入して、優れた結果が得られました。この結果は、プロトコルの上下16倍のダイナミックレンジ要件を十分に満たし、0.18mmカラムの使用によって、濃度範囲を上下両方向に拡大することが確実に可能であることを示しています。

この分離の成功によって、標準のGC装置とヘリウムキャリアに対するこれらのカラムの十分な汎用性も確立されました。このカラムを温度プログラムの最高点（300°C）で使用するときのカラムのヘッド圧は50psiであり、標準のGC装置の作動圧力範囲内に十分に収まっています。

メソッド変換ソフトウェアにより、水素キャリアを使用する元のメソッドが、ヘリウムキャリアを使用する新しいメソッドに正しく変換されました。溶出順序や分離度などの元のメソッドの分離特性は、変換後のメソッドでも厳密に一致しました。この実験は、ソフトウェアを使用したメソッド変換の簡便性を実証しました。元の分離の改善を試みる場合は、変換後のメソッドの設定値をさらに変更するメソッド開発が必要となりました。

参考文献

1. アジレントのメソッド変換ソフトウェアをダウンロードするには、http://www.chem. agilent.com/cag/servsup/usersoft/files/GCTS.htmにアクセスしてください。
2. C. George, “Rapid Analysis of CLP Pesticides Using High-Temperature DB-35ms and DB-XLB Columns,” Application Note 5988-4973EN, December 18, 2001
3. L. Wool and D. Decker, “Practical Fast Gas Chromatography for Contract Laboratory Program Pesticide Analysis,” Journal of Chromatographic Science, Vol. 40 September 2002
4. I. L. Chang, M. S. Klee, and J. Murphy, “Validation Analysis of EPA CLP Target Organochlorine Pesticides with the Agilent 6890 Series GC and Micro-ECD,” Application Note 5966-3742E, February 1998

詳細情報

当社の製品およびサービスの詳細情報については、当社のホームページwww.agilent.com/chem/jpをご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本書に記載されている情報、説明、および仕様は予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2008

Printed in Japan
January 16, 2008
5989-7818JAJP

Agilent Technologies